

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 616 035 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **93116011.3**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/82, C12N 15/56,
C12N 15/29, A01H 5/00,
A01N 63/00**

(22) Anmeldetag: **04.10.93**

Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen Angaben enthält.

(30) Priorität: **09.10.92 DE 4234131**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.09.94 Patentblatt 94/38

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI NL PT
SE**

(71) Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften e.V.
Bunsenstrasse 10
D-37073 Göttingen (DE)**

(72) Erfinder: **Logemann, Jürgen, Dr.
Lavendeltuין 5
NL-2317 NB Leiden (NL)
Erfinder: Jach, Guido
Maternusstrasse 22
D-50678 Köln (DE)
Erfinder: Görnhardt, Birgit
Auf dem Knöpp 28
D-51145 Köln (DE)
Erfinder: Mundy, John, Dr.
NY Carlsberg Vej 6, 4th
1760 V Copenhagen (DK)
Erfinder: Schell, Jeff, Prof.
Carl-vonLinne-Weg 10
D-50829 Köln (DE)
Erfinder: Eckes, Peter, Dr.
Am Flachsland 18
D-65779 Kelkheim (Taunus) (DE)
Erfinder: Chet, Ilan, Prof.
Shikun Ezrachi
Nes Ziona 70400 (IL)**

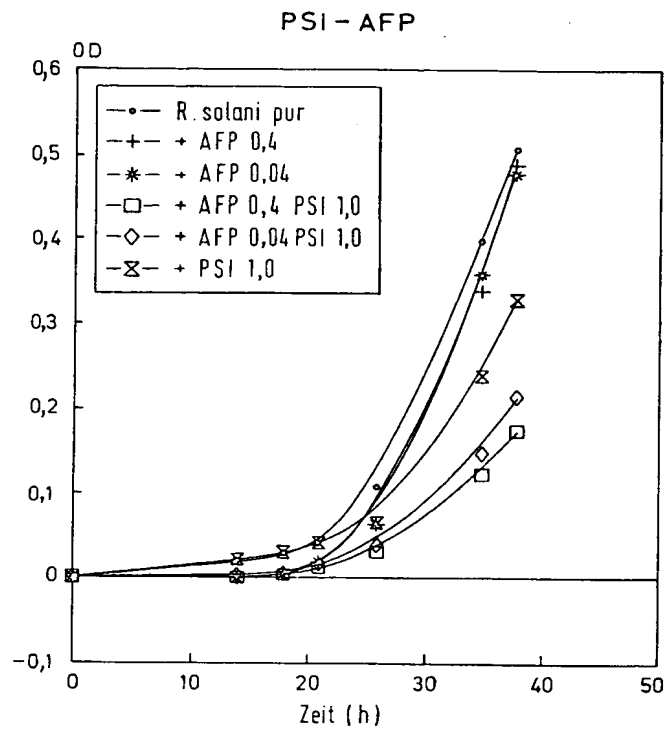
(74) Vertreter: **von Hellfeld, Axel, Dr. Dipl.-Phys.
Wuesthoff & Wuesthoff
Patent- und Rechtsanwälte
Schweigerstrasse 2
D-81541 München (DE)**

(54) **Transgener Pathogen-resistenter Organismus.**

(57) Transgener pathogen-resistenter Organismus dessen Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter Kontrolle aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält. Dieser Organismus zeichnet sich durch eine synergistische pathogen-inhibierende Wirkung aus. Diese Wirkung tritt besonders dann auf, wenn die Gene für die Genprodukte Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP) kodieren.

EP 0 616 035 A2

Fig. 1



Die Erfindung betrifft einen pathogen-resistenten Organismus sowie ein Verfahren zu dessen Erzeugung.

Im Stand der Technik ist bekannt, daß der Befall einer Pflanze durch Pathogene eine Reihe verschiedener Reaktionen hervorgerufen werden. Dazu gehören zum Beispiel Veränderungen in der Zellwandstruktur, die Synthese antimikrobiell wirkender Phytoalexine, die Akkumulation von sogenannten PR-Proteinen ("Pathogenesis-related"), Protease-Inhibitoren und Enzyme mit hydrolytischen Funktionen (Hahlbrock und Grisebach in Ann. Rev. Plant. Physiol., 30, (1979), 105-130).

Viele Pathogene (Pilze und Insekten) weisen als Bestandteil ihrer Zellwand Chitin auf. Demgegenüber besitzen Pflanzen kein Chitin. Es ist nun in einigen Fällen nachgewiesen worden, daß Pflanzen nach einem pathogenen Befall verstärkt Chitinasen produzieren. Chitinasen gehören zu den Enzymen mit hydrolytischen Funktionen und katalysieren den Chitinabbau. Es konnte nun gezeigt werden, daß Pflanzen durch die Produktion von Chitinasen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Pathogene erhalten.

Weiterhin ist die Verwendung eines Gens aus Gerstenpflanzen bekannt, dessen Genprodukt für einen Inhibitor der pilzlichen Proteinsynthese kodiert. Der Einbau eines entsprechenden Inhibitorgens in transgenen Pflanzen führte zu einer verbesserten Pilzresistenz.

Schließlich ist auch bekannt geworden, daß die Verwendung eines Polypeptids aus *Aspergillus giganteus* aufgrund dessen antifungaler Aktivität Pflanzen vor einem Pilzbefall schützen kann.

Gegenüber diesem Stand der Technik besteht aber das Bedürfnis nach der Schaffung weiterer transgener pathogen-resistenter Organismen. Daneben sind solche Organismen besonders erwünscht, deren Resistenz gegenüber den bekannten Organismen insgesamt vergrößert oder bezüglich der Anzahl der möglichen Pathogene verbreitert wird.

Dieses Problem wird durch einen transgenen pathogen-resistenten Organismus mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß der Einbau mindestens zweier unterschiedlicher Gene mit pathogen-inhibierender Wirkung in das Genom eines Organismus diesem zu einer Resistenz gegen Pathogene verhilft, die weit über eine additive Wirkung der Gene jeweils für sich hinausgeht.

In den Unteransprüchen werden weitere Ausführungsformen der Erfindung angegeben.

Die Gene können für Genprodukte kodieren, die die Vitalität von Pilzen herabsetzen. Insbesondere können die Gene pilzlichen, bakteriellen und pflanzlichen, tierischen oder viralen Ursprungs sein. Insbesondere haben die Genprodukte die Pilzresistenz fördernde Eigenschaften. Die Genprodukte sind Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP).

Der transgene pathogen-resistente Organismus kann eine Pflanze sein, vorzugsweise handelt es sich um Tabak-, Kartoffel-, Erdbeer-, Mais-, Raps- oder Tomatenpflanzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen, wie sie in dieser Beschreibung im einzelnen angegeben sind.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Erzeugung pathogen-resistenter Organismen, wie sie hier beschrieben werden, wobei in das Genom eines Organismus mindestens 1 Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung transferiert und der pathogen-resistente Organismus

(a) durch Kreuzung des Organismus mit einem gegebenenfalls transgenen weiteren Organismus, der mindestens ein anderes Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält, und anschließende Selektion und/oder

(b) durch Transformation dieses anderen Gens mit pathogen-inhibierender Wirkung in den Organismus erhalten wird. Das Verfahren kann mit DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen entsprechend einem Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung, wie hier beschrieben, verwendet werden.

Schließlich ist ein Verfahren zur Erzeugung pathogen-resistenter Organismen Gegenstand der Erfindung, wobei zur Transformation in das Genom eines Organismus Vektoren verwendet werden, die mehr als ein Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung umfassen.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Gewährleistung der Resistenz von Organismen gegen Pathogene, dadurch gekennzeichnet, daß als Organismus ein transgener pathogen-resistenter Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Organismus, dessen Genom mindestens ein Gen gemäß den hier verwendeten Definitionen (siehe Ansprüche 1 bis 7) enthält, verwendet und auf den Organismus mindestens eine Substanz aufgebracht wird, die nicht durch den Organismus exprimiert wird, aber irgendeinem anderen der Genprodukte gemäß den in dieser Anmeldung gegebenen Definitionen (Ansprüche 1 bis 7) entspricht.

Die synergistischen Wirkungen konnten ganz besonders mit transgenen pathogen-resistenten Organismen erzielt werden, auf die Gensequenzen transferiert oder transfiziert waren, die für Proteine der anhängenden Sequenzprotokolle A bis E kodierten bzw. diesen entsprachen.

ChiS:

Aus dem Bodenbakterium *Serratia marcescens* wurde ein 1,8 Kb großes DNA Fragment isoliert, daß für eine Chitinase, genannt ChiS, kodiert. In vitro Untersuchungen mit gereinigtem ChiS-Protein zeigten, daß es in geringen Konzentrationen bereits das Wachstum von Pilzen wirksam inhibieren kann. Die Ursache für die Inhibition ist, daß das ChiS-Protein über eine Chitinaseaktivität verfügt, mit der die Hyphenspitzen des Pilzes zerstört werden können. Auf diese Weise kann der Pilz nicht weiterwachsen und wird inhibiert.

PSI:

Das PSI-Gen stammt aus Gerste und kodiert für ein Protein, welches die Proteinsynthese von Pilzen inhibiert. Nach in vitro Tests reichen bereits geringe Konzentrationen PSI aus, um diverse Pilze wie zum Beispiel *Rhizoctonia solani* zu inhibieren.

AFP:

Aus der Fermentationsbrühe von *Aspergillus giganteus* kann ein Polypeptid isoliert und sequenziert werden, welches über antifungale Aktivität verfügt. Dieses Polypeptid eignet sich als antifungales Agens, z.B. als Sprühmittel und als Konservierungsstoff für technische Produkte und Nahrungs- und Futtermittel. Es kann weiterhin mit anderen pestizid wirksamen Stoffen, Düngemitteln oder Wachstumsregulatoren kombiniert werden. Inhibitorische Aktivitäten gegen Pilze konnten unter Anderem gegen verschiedene *Aspergillus*-, *Fusarien*-, *Phytophthora*- und *Trichophyton*-Arten nachgewiesen werden.

ChiG und GluG:

Aus bestimmten Gerstearten lassen sich zwei Gene isolieren, die für eine Chitinase (ChiG) bzw. Glukanase (GluG) kodieren. Gereinigtes ChiG-Protein oder GluG-Protein inhibiert in vitro diverse pflanzenpathogene Pilze (u.A. *Rhizoctonia solani*) (siehe R. Leah et al., *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, No. 3 (1991), Seiten 1564-1573).

Die Erfinder haben nun völlig überraschend festgestellt, daß die mindestens zweifache kombinierte Expression von PSI, AFP, ChiS, ChiG oder GluG bezüglich der erworbenen Pilzresistenz bei transgenen Pflanzen zu synergistischen Effekten führt. Insbesondere werden die Wirkungen der Einzelsubstanzen in der Kombination deutlich übertroffen. Hierzu gehören die Resistenz gegen den Pilz *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia*-Befall, *Botrytis*-Befall usw.

Erfindungsgemäße Kombinationen sind (DNA und/oder Polypeptide):

(Zweierkombinationen)

ChiS, GluG; ChiS, PSI; ChiS, ChiG; ChiS, AFP; GluG, PSI; GluG, ChiG; GluG, AFP; PSI, ChiG; PSI, AFP;

(Dreierkombinationen)

ChiS, GluG, PSI; ChiS, GluG, ChiG; ChiS, GluG, AFP; GluG, PSI, ChiG; GluG, PSI, AFP; PSI, ChiG, AFP; ChiG, AFP, GluG

(Viererkombinationen)

ChiS, GluG, PSI, AFP; ChiS, GluG, PSI, ChiG;

(Fünferkombination)

Chis, GluG, PSI, AFP, ChiG

5 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die kombinierte Verwendung der Proteine mit pathogen-inhibierender Wirkung, vorzugsweise ChiS, PSI, AFP, ChiG und GluG, gegen Pathogene. Kombinierte Verwendung bedeutet hier auch, daß mindestens eine erste pathogene inhibierende Substanz von dem Organismus exprimiert und mindestens eine zweite Substanz, die pathogen inhibierende Wirkung hat, von außen auf den Organismus aufgebracht wird.

10 Zu den erfindungsgemäßen Mitteln zählen auch jene, die die oben genannten Proteine in mindestens zweifacher Kombination enthalten. Die erfindungsgemäßen Mittel können neben den Proteinen weitere Wirkstoffe enthalten. Diese weiteren Wirkstoffe können Pestizide, Düngemittel und/oder Wachstumsregulatoren sein, die erfindungsgemäßen Mittel können zudem in unterschiedlichen Formulierungen bereitgestellt werden, wie Konzentrate, Emulsionen, Pulver, Formulierungen auf Trägerstoffen, Mischungen mit anderen
15 Wirkstoffen, etc. Besonders bevorzugt wird die Kombination ChiS/PSI und AFP/PSI. Diese Proteine können besonders wirksam zur Wachstumshemmung von Rhizoctonia solani, insbesondere bei Tabakpflanzenkulturen, eingesetzt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer DNA-Sequenz in einem erfindungsgemäßen Verfahren, die mindestens für ein Polypeptid der Sequenzen A bis E kodiert, bzw. ein pathogen-resistenter
20 Organismus, wobei dessen Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter der Kontrolle aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält, wobei die Gene jeweils aus der Gruppe der Sequenzen A bis E ausgewählt sind. Die Erfindung schließt weiterhin DNA-Sequenzen ein, die mit einer DNA-Sequenz hybridisiert, welche für Polypeptide der Aminosäuresequenzen A bis E kodiert, wobei diese DNA-Sequenzen natürlichen synthetischen oder halbsynthetischen Ursprungs sein kann und mit der zuvor
25 genannten DNA-Sequenz durch Mutationen, Nukleotidsubstitutionen, Nukleotiddeletionen, Nukleotidinsertionen und Inversionen von Nukleotidfolgen verwandt sein kann und für ein Polypeptid mit pathogener Wirksamkeit kodiert. Gegenstand der Erfindung ist weiter noch ein rekombinantes DNA-Molekül, welches mindestens eine DNA-Sequenz nach den vorstehenden Ausführungen enthält, wobei dieses DNA-Molekül als Klonierungs- oder Expressionsvektor vorliegen kann.

30 Gegenstand der Erfindung sind entsprechende Wirtsorganismen und Zwischenwirte, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül nach den vorstehenden Ausführungen transformiert sind. Als Zwischenwirt bei der Erzeugung eines pathogen-resistenten transgenen Organismus werden Bakterienstämme bevorzugt, insbesondere sogenannte Agrobakterienstämme.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen
35 transgenen pathogen-resistenten Organismen, insbesondere Tabak-, Kartoffel-, Mais-, Erbsen-, Raps- und Tomatenpflanzen.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden in der Regel zusammen mit einem Promotor transferiert. Promotorsequenzen werden vom pflanzlichen Transkriptionsapparat erkannt und führen somit zu einer konstitutiven Expression des mit ihnen verbundenen Gens in Pflanzen. Der Promotor kann aber auch
40 Pathogen-induzierbar und/oder verwundungs-induzierbar (WUN1) und/oder gewebespezifisch und/oder entwicklungsspezifisch sein.

Die zur Durchführung der Erfindung erforderlichen gentechnologischen Arbeiten, insbesondere zur Expression des Gens in Pflanzen, sind allgemein bekannt. Beispielsweise aus der Veröffentlichung von Maniatis et al. in "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbour (1982)

45 Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert.

Alle molekularbiologischen Standard-Methoden wurden, sofern nicht anders angegeben, wie bei Maniatis et al. "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour, (1982) beschrieben, durchgeführt.

Die für die Aminosäuresequenzen A bis E kodierende DNA wurde zunächst in an sich bekannter Weise kloniert und dann durch Konjugation nach A. Tumefaciens LBA 4404 (A. Hoekema et al., Nature 303, 179-
50 180) transferiert. Dies geschah nach der von Van Haute et al. in EMBO J. 2, 411-418 (1983), beschriebenen Methode.

Die Überprüfung der DNA-Transfers in das Agrobakterium erfolgte durch die Isolierung von Agrobakterien-DNA nach der von Ebert et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 5745-5749 (1987), geschilderten Methode. Die Restriktionsspaltung der DNA, der Transfer auf Hybond-N-Membran (Amersham) und die
55 Hybridisierung gegen eine radioaktiv markierte DNA-Sonde gaben Aufschluß über einen erfolgreichen DNA-Transfer in das Agrobakterium.

Mittels des transformierten Agrobakteriums wurden wiederum Tabak-, Raps-, Erdbeer-, Tomaten- und Kartoffelpflanzen transformiert.

Die zur Infektion benötigten Agrobakterien LBA 4404 wurden in selektivem Antibiotika-Medium angezogen (P. Zambrisky et al. in EMBO J., 1, 147-152 (1983)), durch Zentrifugation sedimentiert und in YEB-Medium ohne Antibiotika gewaschen (YEB = 0,5% Fleisch-Extrakt; 0,2% Hefeextrakt; 0,5% Pepton; 0,5% Saccharose; 2mM MgSO₄). Nach erneuter Sedimentation und Aufnahme in MgSO₄ konnten die Bakterien zur Infektion verwendet werden.

Zur Infektion wurde die sogenannte Blattscheibenmethode eingesetzt.

Für die Blattscheiben-Infektion wurden sterile Blätter verwendet. Etwa 1 cm große Blattstücke werden in die zuvor beschriebene Agrobaktériensuspension eingetaucht und anschließend auf 3MS-Medium überführt (Medium nach T. Murashige und F. Skoog in Physiol. Plant., 15, 473-497 (1962); 3MS = MS + 3% Saccharose). Nach zweitägiger Inkubation bei 16 Stunden Licht und 25 °C bis 27 °C wurden die Blattstücke auf MSC16-Medium (nach T. Murashige (siehe oben); MSC16 = MS + 0,5 µg/ml BAP + 0,1 µg/ml NAA + 100 µg/ml Kanamycinsulfat + 500 µg/ml Claforan) überführt. Nach 4-6 Wochen erscheinende Sprosse wurden abgeschnitten und auf MSC15-Medium (nach Murashige (siehe oben); MSC15 = MS + 2% Saccharose, 500 µg/ml Claforan + 100 µg/ml Kanamycinsulfat) umgesetzt. Sprosse mit Wurzelbildung wurden weiter analysiert.

Monokotyledone Pflanzen (u. a. Mais), zum Teil aber auch dikolyte Pflanzen wurden mittels direktem Gentransfer in Protoplasten transformiert. Diese Protoplasten wurden anschließend zu intakten Pflanzen regeneriert (Beispiel: J. Potrykus in Biotechnology 8 (1990) 535).

Die erhaltenen transgenen Pflanzen wurden zu Testzwecken mit dem Pilz *Rhizoctonia solani* infiziert. Hierzu wurden Pilzkulturen gezüchtet und in Einheitserde gründlich vermischt. Diese Erde wurde dann in einer Schale verteilt und mit den zu testenden Pflanzen bepflanzt.

Zur Auswertung wurde jeder Pflanze einer Schale ein Wert von 0 bis 3 zugeordnet. Daraus konnte für jede Pflanzenlinie ein Index berechnet werden, der sich aus der Summe der Werte ergab. Die Einteilung ist wie folgt:

- 0 = Ohne Symptome (gesund)
- 1 = leicht reduzierte Größe (gegenüber einer nicht-infizierten Kontrolle); kein bis sehr geringer sichtbarer Befall
- 2 = starke Wachstumsreduktion; schwere Befallssymptome
- 3 = tot

Die Bewertung erfolgt jeweils 14 Tage nach Start der Versuchsreihe.

Beispiel 1:

Pilzinhibitionstest mit kombinierten Proteinen

Es sollte zunächst einmal gezeigt werden, daß die hier verwendeten Proteine in ihrer Kombination synergistische Wirkungen haben. Hierzu wurden in vitro Pilzwachstumstests durchgeführt.

Hierbei wurde eine definierte Menge an *Rhizoctonia solani* Pilzmycel mit 100 µl-Kartoffel-Dextroselösung versetzt und in Mikrotiterplatten bei 25 °C inkubiert. Dabei korreliert das Wachstum des Pilzes mit der Zunahme der optischen Dichte bei 405 Nanometer linear. Die inhibierende Wirkung von Proteinen kann anhand eines geringeren Anstiegs der optischen Dichte nachgewiesen werden.

Aus einer Flüssigkultur von *R. Solani* wurden 2-3 Mycelbällchen entnommen, in einem Eppendorfgefäß mit 100 µl KGB-Medium versetzt und mit einem Glasmörser vorsichtig homogenisiert. Diese Suspension wurde dann mit 10 ml KGB-Medium gemischt und durch ein steriles 100 µm Sieb gegeben. Die optische Dichte dieser Mycelfragment-Suspension (100 µl-Aliquot) wurde durch Zugabe von Medium auf einen Wert von 0,06-0,07 bei 405 Nanometer eingestellt. Je 100 µl wurden auf eine Mikrotiterplatte gegeben und mit den zu testenden Proteinen versetzt. Pro Ansatz wurden 7 Parallelen gemessen. Als Kontrolle dienen Ansätze, die mit den entsprechenden Mengen an Puffer versetzt wurden. Die Platten wurden über 48 Stunden bei 25 °C im Dunkeln inkubiert und die optische Dichte der Kulturen in regelmäßigen Abständen gemessen.

Ob zwei Proteine bei der Wachstumshemmung des Pilzes in additiver synergistischer oder antagonistischer Weise zusammenwirken, läßt sich aus den gemessenen Daten mit Hilfe der im folgenden beschriebenen und allgemeinen angewandten Colby-Formel errechnen (S. R. Colby in Wheeds, 15 (1967), 20-22).

Hierzu war es zunächst notwendig, die bei einem additiven Verhalten theoretisch zu erwartende Wachstumshemmung E (der erwartete Wirkungsgrad) zu berechnen. Dieser ist gegeben durch:

$$E = W1 + W2 - ((W1 \times W2)/100)$$

Dabei geben W1 und W2 die Wirkungsgrade der einzelnen Proteine an, worunter man die prozentuale Abweichung der Wachstumskurve (in Anwesenheit des Proteins) von der unbehandelten Kontrolle versteht. Der Wirkungsgrad für ein Protein ist (zu einem bestimmten Zeitpunkt der Wachstumskurve) gegeben durch:

$$5 \quad W1 = (OD(K) - OD(P))/OD(K) \times 100 \quad (\text{Prozent})$$

Hierbei ist OD(K) die optische Dichte der unbehandelten Kontrolle und OD(P) die optische Dichte der mit dem Protein behandelten Kultur.

- Bei der kombinierten Anwendung von zwei Proteinen waren somit folgende Aussagen möglich: Ist der im Experiment gemessene Wirkungsgrad G gleich dem Erwartungswert E, so handelt es sich um ein additives Verhalten. Ist G hingegen größer als E, so liegt synergistisches Verhalten vor.

Unter Verwendung dieses Prüfmodells ergaben sich für die im Beispiel verwendeten Proteine ChiS, PSI, AFP, ChiG und GluG überraschenderweise synergistische Hemmeffekte gegen diverse Pilze, wobei diese Effekte sowohl durch die Kombination zweier Proteinarten, als auch durch die Mehrfachkombination der obengenannten Proteine erreicht wurde.

Beispielsweise wurde aus der Kombination von ChiS und PSI-Protein, bzw. aus der Kombination von AFP- und PSI-Protein gegen den Pilz *Rhizoctonia solani* folgende Werte ermittelt (je zwei verschiedene ChiS und AFP-Konzentrationen bei konstanter RIP-Konzentration):

20 ChiS + PSI:

Die Erwartungswerte waren: $E1 = 29,9\%$ und $E2 = 44,5\%$

Die gemessenen Werte waren: $G1 = 60,4\%$ und $G2 = 64,1\%$

Die Proteine ChiS und PSI wirken also bei der Wachstumshemmung von *R. Solani* in synergistischer Weise zusammen.

Die Fig. 1 zeigt die Ergebnisse, die mit der Kombination der Proteine, als auch mit den Einzelsubstanzen erhalten wurden. Nach der Figur werden verschiedene ChiS-Konzentrationen ($0,5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,05 \mu\text{g/ml}$) mit PSI-Protein ($1,0 \mu\text{g/ml}$) kombiniert.

30 AFP + PSI:

Die Erwartungswerte waren: $E1 = 39,9\%$ und $E2 = 41,9\%$

Die gemessenen Werte waren: $G1 = 57,7\%$ und $G2 = 65,4\%$

Auch die Kombination AFP und PSI zeigt demnach eine synergistische Wachstumshemmung des Pilzes *R. Solani* an. In der Fig. 2 werden die Testergebnisse bei verschiedenen AFP-Konzentrationen ($0,4 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,04 \mu\text{g/ml}$) mit PSI-Protein ($1,0 \mu\text{g/ml}$) kombiniert angegeben.

Beispiel 2:

40 Transgene Pflanzen

Um die erfindungsgemäßen Organismen mit synergistisch zusammenwirkenden DNA-Sequenzen zu erhalten, wurden zunächst transgene Pflanzen erzeugt, die mindestens eines der synergistisch zusammenwirkenden Gene enthielten.

45 ChiS in transgenen Pflanzen

Es wurde zunächst ein ChiS-Gen mit pflanzlichen Regulations-sequenzen fusioniert.

Ein 1,8 Kb großes ChiS-Gen wurde durch die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden nach der Dideoxy-sequenzierungsmethode von Sanger et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, (1977), 5463-5467, sequenziert.

Der aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CamV) stammende 35S-Promotor (400 bp (nach Töpfer et al. in Nucl. Acid. Res., 15 (1987) 5890)) wurde transskriptionell mit dem ChiS-Gen fusioniert. 3' vom ChiS-Gen wurde das 0,2 Kb große Terminationssignal des 35S-Gens des CamV verwendet, dessen Funktionalität in dikotylen Pflanzen bekannt ist. Das chimäre Gen 35S-ChiS wurde in den Vektor pLS034 kloniert, mittels des Agrobacterium tumefaciens-Transformationssystems in Tabak- und Kartoffelpflanzen transformiert und Kanamycin-resistente Pflanzen regeneriert.

In den erhaltenen Pflanzen konnte sowohl das ChiS-Gen als auch die entsprechende mRNA sowie das Genproduktprotein nachgewiesen werden.

PSI in transgenen Pflanzen

Aus reifen Gerstesamen (*Hordeum vulgare* L. cv. Piggy) wurde zunächst PolyA⁺ RNA isoliert und in einer cDNA-Genbank in λ -gt-11-Phagen abgelegt. Die Einzelheiten des Verfahrens sind R. Lea in Plant. Biol., 12 (1989), 673-682, zu entnehmen. Mit Hilfe monospezifischer PSI-Antikörper wurden dann cDNA-Klone identifiziert.

Im Anschluß daran wurden die PSI-positiven λ -gt-11-Phagen isoliert, weiter kloniert und nach der oben angegebenen Dideoxy-sequenzierungsmethode von Sanger et al. sequenziert. Die in *E. Coli* geklonte DNA wurde dann in der oben beschriebenen Weise durch Konjugation auf das Agrobakterium tumefaciens LBA4404 übertragen.

Sowohl das transferierte Gen als auch mRNA und Genprodukt konnten in entsprechenden transgenen

Tabak-, Kartoffel-, Raps-, Erdbeer- und Tomatenpflanzen nachgewiesen werden.

AFP in transgenen Pflanzen

Die cDNA-Sequenz des antifungischen Peptids wird für die Klonierung im Vektor mit Enden versehen, die in BamH1- und Sal1-Restriktionsschnittstellen ligiert werden können. Als Klonierungsvektor wurde pDH51 (Pietrzak et al. in Nucl. Acids Res. 14 (1986), 5857) verwendet. Der Vektor pDH51 wurde mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Sal1 zwischen Promotor und Terminator geöffnet. Der Vektor pDH51 ist ein pUC18-Derivat, das Promotor- und Terminatorsequenzen des 35S-Transkripts aus Blumenkohlmosaikvirus enthält. Diese Sequenzen werden vom pflanzlichen Transkriptionsapparat erkannt und führen zu einer starken konstitutiven Expression des mit ihnen verbundenen Gens in Pflanzen. Die DNA des antifungischen Peptids wird dann über die BamH1 und Sal1-Schnittstelle in den Vektor kloniert. Schließlich wird die Transkriptionseinheit - Promotor, Gen und Terminator - mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem Vektor herausgeschnitten und in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert. Als Pflanzentransformationsvektor können zum Beispiel folgende Vektoren bzw. ihre Derivate verwendet werden:

pOCA18 (Olszewski et al. in Nucl. Acids Res., 16 (1988), 10765) pPCV310 (Koncz und Shell in MGG 204 (1986), 383) und pBin19 (Bevan et al. Nucl. Acids. Res. 12 (1984) 8711)

Nachdem die Transkriptionseinheit und der Vektor über die EcoRI-Schnittstelle ligiert wurde, wurde das Konstrukt in den Agrobakterienstamm MP90RK (Koncz und Shell (siehe oben)) oder IHA101 (Hood et al. in J. Bacteriol. 168 (1986), 1291) konjugiert.

Transgene Tabak-, Kartoffel-, Erdbeer-, Raps- und Tomatenpflanzen wurden dann nach der oben beschriebenen Methode transformiert. Transformierte Sprosse werden aufgrund der mitübertragenen Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin selektioniert. Durch DNA-Analyse (Southern Blotting), RNA-Analyse (Northern Blotting) und Proteinanalyse mit spezifischen Antikörpern (Western Blotting) wurde die Expression des antifungischen Proteins in den transformierten Nutzpflanzen überprüft und bestätigt.

ChiG und GluG in transgenen Pflanzen

Analog zu den zuvor beschriebenen Pflanzen konnten ChiG- bzw. GluG-transgene Pflanzen erhalten werden, die sowohl Southern-, Northern- als auch Western-positiv waren.

ChiS, PSI, AFP, ChiG, GluG in transgenen monokotylen Pflanzen

Die zuvor genannten Gene konnten mittels direktem Gentransfer in das Genom monokotyler Pflanzen wie beispielsweise Mais integriert werden. Hierbei wurden transgene Pflanzen erhalten, die sowohl Southern- als auch Northern- und Western-positiv waren.

Kombination verschiedener Pilzresistenzgene in transgenen Pflanzen

Die zuvor erhaltenen Tabak-, Mais-, Raps-, Erdbeer-, Kartoffel- und Tomatenpflanzen wurden miteinander gekreuzt und auf Pflanzen selektioniert, die jeweils die Pilzresistenzgene beider Eltern beinhalteten. Darüberhinaus wurden transgene Pflanzen dadurch erhalten, daß sie zunächst mit einem und dann mit einem oder mehreren weiteren Gen transformiert wurden. Schließlich wurden auch noch Pflanzen mit Vektoren transformiert, die verschiedene Resistenzgene beinhalteten. Mit diesem Pflanzengut wurden

Pilzresistenztests gemacht. Überraschenderweise sind in allen Fällen nicht nur additive Effekte bezüglich der Pilzresistenz zu beobachten, sondern synergistische Effekte.

Beispielsweise zeigt eine Tabakpflanze, die ChiS und PSI exprimiert, eine wesentlich stärkere Widerstandsfähigkeit gegen Rhizoctonia-Befall als die Pflanzen, die entweder nur ChiS oder PSI exprimierten, oder die sich aus der additiven Widerstandsfähigkeit ergeben würde.

Ein synergistischer Hemmeffekt ergibt sich auch aus der kombinierten Expression von PSI- und AFP-transgenen Tabak gegen Rhizoctonia solani Befall. Auch die zwei- oder mehrfache Kombination verschiedener Gene (ChiS, RIP, AFP, ChiG und GluG) in den unterschiedlichsten transgenen Pflanzen führte zu synergistischen Hemmeffekten gegen diverse Pilze.

Während Wildtyppflanzen bei Tests mit 20 Sämlingen Indexwerte von 38 bis 46 aufweisen, erweist sich bei erfindungsgemäßen transgenem Tabak, daß dieser in Anwesenheit des Pilzes Rhizoctonia solani so gut wächst wie Kontrollpflanzen (Indexwert 10-12), die auf Rhizoctonia-freiem Boden kultiviert wurden.

Sequenzprotokoll A bzw. A' (AFP):

Seq IDNo.: 1 (A)

Art der Sequenz: Vollständige Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein, soweit es durch ein offenes Ableseraster codiert wird, wirksames Protein (A')

Sequenzlänge: 51 Aminosäuren (A')

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Art des Moleküls: cDNA

Ursprüngliche Herkunft: Fermentationsbrühe von Aspergillus giganteus

Name: Antifungisches Peptid (AFP)

Merkmale (A):

Offenes Ableseraster von 177 Nukleotiden, die N-terminale Aminosäure des wirksamen Proteins ist mit * markiert.

Eigenschaften: Antifungisches Agens, insbesondere gegen Rhizoctonia solani, verschiedene Aspergillus-, Fusarien- und Trichophyton-Arten.

M O E M R -

Sequenzprotokoll B bzw. B' (PSI):

5 Seq IDNo.: 2

Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein

Sequenzlänge: 1078 Basenpaare (B' = unvollständiger

PSI-cDNA-Klon)

10 Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

Art des Moleküls: komplementär DNA

15 Ursprüngliche Herkunft: Gerstesamen (Hordeum vulgare L.cv.

Piggy)

Unmittelbare experimentelle Herkunft: cDNA-Genbank in

λ -gt-11-Phagen

20 Name: Proteinsyntheseinhibitor

Merkmale:

42 bp-lange 5'-nicht-übersetzende Region

25 Offenes Ableseraster von 843 Basenpaaren (das Stopcodon ist mit einem Sternchen markiert)

193 basenpaarlanges 3'-nicht-übersetztes Ende,

mögliche Polyadenylierungssignale sind unterstrichen

30 Eigenschaften:

Antifungal wirksam, insbesondere gegen Sporen von Trichoderma

reesei und fusarium sporotrichoides sowie gegen Rhizoctonia

35 solani.

CTTAATAGCACATCTTGTCCGTCTTAGCTTTGCATTACATCCATGGCGGCAAAGATGGCG

40 * M A A K M A
-1 1

AAGAACGTGGACAAGCCGCTCTTCACCGCGACGTTCAACGTCCAGGCCAGCTCCGCCGAC

45 K N V D K P L F T A T F N V Q A S S A D
10 20

TACGCCACCTTCATCGCCGGCATCCGCAACAAGCTCCGCAACCCGGCGCACTTCTCCAC

50 Y A T F I A G I R N K L R N P A H F S E
30 40

55

AACCGCCCCGTGCTGCCGCCGGTCGAGCCCAACGTCCCGCCGAGCAGGTGGTTCCACGTC
 N R P V L P P V E P N V P P S R W F H V
 50 60

GTGCTCAAGGCCTCGCCGACCAGCGCCGGGCTCACGCTGGCCATTCTGGGCGGACAACATC
 V L K A S P T S A G L T L A I R A D N I
 70 80

TACCTGGAGGGCTTCAAGAGCAGCGACGGCACCTGGTGGGAGCTCACCCCGGGCCTCATC
 Y L E G F K S S D G T W W E L T P G L I
 90 100

CCCGGCGCCACCTACGTCCGGTTCGGCGGCACCTACCGCGACCTCCTCGGCGACACCGAC
 P G A T Y V G F G G T Y R D L L G D T D
 110 120

AAGCTGACCAACGTGCTCTCGGCCGGCAGCAGCTCCCGGACGCGGTGACCGCCCTCCAC
 K L T N V A L G R Q Q L A D A V T A L H
 130 140

GGGCGCACCAAGGCCGACAAGCCGTCCGGCCCCGAAGCAGCAGCAGGCGAGGGAGGCGGTG
 G R T K A D K P S G P K Q Q Q A R E A V
 150 160

CGACGCTGCTCCTCATGGTGAACGAGGCCACGCGGTTCCAGACGGTGTCTGGGTTTCGTG
 T T L L L M V N E A T R F Q T V S G F V
 170 180

3CCGGGTTGCTGCACCCCAAGGCGGTGGAGAAGAAGAGCGGGAAGATCGGCAATGAGATG
 A G L L H P K A V E K K S G K I G N E M
 190 200

AAGGCCCAGGTGAACGGGTGGCAGGACCTGTCCGCGGCGCTGCTGAAGACGGACGTGAAG
 K A Q V N G W Q D L S A A L L K T D V K
 210 220

CCTCCGCGGGGAAAGTCGCCAGCGAAGTTCGCGCCGATCGAGAAGATGGGCGTGAGGACG
 P P P G K S P A K F A P I E K M G V R T
 230 240

GCTGTACAGGCCGCCAACACGCTGGGGATCCTGCTGTTCTGCGTGGAGGTGCCGGGTGGGTTG
A V Q A A N T L G I L L F V E V P G G L
250 260

ACGGTGGCCAAGGCGCTGGAGCTGTTCCATGCGAGTGGTGGGAAATAGGTAGTTTTCCAG
T V A K A L E L F H A S G G K *

GTATACCTGCATGGGTAGTGTAAAAGTCGAATAAACATGTCACAGAGTGACGGACTGATA

TAAATAAATAAATAAACGTGTCACAGAGTTACATATAAACAAATAAATAAATAATTAAAA

ATGTCCAGTTTA₄₇

B'
-CGGTGACGACGCTGCTCCTCATGGTGAACGAGGCCACGCGGTTCCAGACGGTGTCTGGGG
A V T T L L L M V N E A T R F Q T V S G
170 180

FTCGTGGCCGGGCTGCTGCACCCCAAGGCGGTGGAGAAGAAGAGCGGGAAGATCGGCAAT
F V A G L L H P K A V E K K S G K I G N
190 200

SAGATGAAGGCCCGAGGTGAACGGGTGGCAGGACCTGTCCGCGGCGCTGCTGAAGACGGAC
E M K A Q V N G N Q D L S A A L L K T D
210 220

GTGAAGCCCCCGCCGGGAAAGTCGCCAGCGAAGTTCACGCCGATCGAGAAGATGGGCGTG
V K P P P G K S P A K F T P I E K M G V
230 240

AGGACTGCTGAGCAGGCTGCGGCTACTTTGGGGATCCTGCTGTTTCGTTGAGGTGCCGGGT
R T A E Q A A A T L G I L L F V E V P G
250 260

GGGTTGACGGTGGCCAAGGCGCTGGAGCTGTTTCATGCGAGTGGTGGGAAATAGGTAGTT
G L T V A K A L E L F H A S G G K *

TTGCAGGTATACCTGCATGGGTAAATGTAAAAGTCGAATAAAAAATGTCACAGAGTGACGG

ACTGATATAAATAAATTAATAAACATGTCATCATGAGTGACAGACTGATATAAATAAATA

Sequenzprotokoll C (ChiS):

Seq IDNo.: 3

Art der Sequenz: Nukleotid

Strangform: Einzelstrang (der aktivierte Strang ist Doppelstrang)

Topologie: linear

Art des Moleküls: cDNA

Unmittelbare experimentelle Herkunft: Plasmid pLChiS aus dem E. Coli-Stamm A 5187

Ursprüngliche Herkunft: Cosmidbank aus Serratia Marcescens

Name: ChiS-Protein (Chitinase)

Eigenschaften: Exo-Chitinase

C

```

1  CAGGGCGTTG TCAATAATGA CAACACCCTG GCTGAAGAGT GTGGTGCAAT
51 ACTGATAAAT ATTTATCTTT CCTTAATAGA AAATTCACCTA TCCTTATTTG
101 TCATGTTTTT TTTTATTTAT ATGAAAATAA ATTCACGCTT GCTGAATAAA
151 ACCCAGTTGA TAGCGCTCTT GTTTTTGCGC CTTTTTTATT TATAGTACTG
201 AATGTACGCG GTGGGAATGA TTATTTTCGCC ACGTGGAAG ACGCTGTTGT
251 TATTTATTGA TTTTAACCTT CGCGGATTAT TGCGGAATTT TTTGCTTCG
301 GCAATGCATC GCGACGATTA ACTCTTTTAT GTTTATCCTC TCGGAATAAA
351 GGAATCAGTT ATGCGCAAAT TTAATAAACC GCTGTTGGCG CTGTTGATCG
401 GCAGCACGCT GTGTTCCGCG GCGCAGGCCG CCGCGCCGGG CAAGCCGACC
451 ATCGCCTGGG GCAACACCAA GTTCGCCATC GTTGAAGTTG ACCAGGCGGC
501 TACCGCTTAT AATAATTTGG TGAAGGTAAA AAATGCCGCC GATGTTTCCG
551 TCTCCTGGAA TTTATGGAAT GGCGACACCG GCACGACGGC AAAAGTTTTA
601 TTAAATGGCA AAGAGGCGTG GAGTGGTCCT TCAACCGGAT CTTCCGGTAC
651 GGCGAATTTT AAAGTGAATA AAGGCGGCCG TTATCAAATG CAGGTGGCAC
701 TGTGCAATGC CGACGGCTGC ACCGCCAGTG ACGCCACCGA AATTGTGGTA
751 GCCGACACCG ACGGCAGCCA TTTGGCGCCG TTGAAAGAGC CGCTGCTGGA
801 AAAGAATAAA CCGTATAAAC AGAACTCCGG CAAAGTGGTC GGTTCCTTATT

```

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

851 TCGTCGAGTG GGGCGTTTAC GGGCGCAATT TCACCGTCGA CAAGATCCCG
 901 GCGCAAAACC TGACCCACCT GCTGTACGGC TTTATCCCGA TCTGCGCGG
 951 CAATGGCATC AACGACAGCC TGAAAGAGAT TGAAGGCAGC TTCCAGGCGT
 1001 TGCAGCGCTC CTGCCAGGGC CGCGAGGACT TCAAAGTCTC GATCCACGAT
 1051 CCGTTCGCCC CGCTGCAAAA AGCGCAGAAG GGCCTGACCG CCTGGGATGA
 1101 CCCCTACAAG GGCAACTTCG GCCAGCTGAT GCGCTGAAG CAGGCGCATC
 1151 CTGACCTGAA AATCCTGCCG TCGATCGGGC GCTGGACGCT GTCCGACCCG
 1201 TTCTTCTTCA TGGGCGACAA GGTGAAGCGC GATCGCTTCG TCGGTTCCGT
 1251 GAAAGAGTTC CTGCAGACCT GGAAGTTCTT CGACGGCGTG GATATCGACT
 1301 GGGAGTTCCC GGGCGGCAAA GGCGCCAACC CTAACCTGGG CAGCCCGCAA
 1351 GACGGGAAA CCTATGTGCT GCTGATGAAG GAGCTGCGGG CGATGCTGGA
 1401 TCAGCTGTCTG GTGGAACCG GCCGCAAGTA TGAGCTGACC TCCGCCATCA
 1451 GCGCCGGTAA GGACAAGATC GACAAGGTGG CTTACAACGT TGCGCAGAAC
 1501 TCGATGGATC ACATCTTCCT GATGAGCTAC GACTTCTATG GCGCTTCGA
 1551 TCTGAAGAAC CTGGGGCATC AGACCGCGCT GAATGCGCCG GCCTGGAAAC
 1601 CGGACACCGC CTACACCACG GTGAACGGCG TCAATGCGCT GCTGGCGCAG
 1651 GGCCTCAAGC CGGGCAAAAT CGTCGTGGC ACCGCCATGT ATGGCCGCGG
 1701 CTGGACCGGG GTGAACGGCT ACCAGAACA TATTCCGTTT ACCGGCACCG
 1751 CCACCGGGCC GGTAAAGGC ACCTGGGAGA ACGGTATCGT GGAATACCGC
 1801 CAAATCGCCG GCCAGTTCAT GAGCGCGAG TGGCAGTATA CCTACGACGC
 1851 CACGGCGGAA GCGCCTTACG TGTTCAAACC TTCCACCGGC GATCTGATCA
 1901 CCTTCGACGA TGCCCGCTCG GTGCAGGCTA AAGGCAAGTA CGTGTGGAT
 1951 AAGCAGCTGG GCGGCCTGTT CTCCTGGGAG ATCGACGCGG ATAACGGCGA
 2001 TATTCTCAAC AGCATGAACG CCAGCCTGGG CAACAGCGCC GCGTTCAAT
 2051 AATCGGTTGC AGTGGTTGCC GGGGATATC CTTTCGCCCC CGGCTTTTTC
 2101 GCCGACGAAA GTTTTTTAC GCCGCACAGA TTGTGGCTCT GCGCCGAGCA
 2151 AAACGCGCTC ATCGGACTCA CCCTTTTGGG TAATCCTTCA GCATTTCTCT
 2201 CTGTCTTTAA CGGCGATCAC AAAAATAACC GTTCAGATAT TCATCATTC
 2251 GCAACAAAGT TTTGGCGTTT TTTAACGGAG TTAAAAACCA GTAAGTTTGT
 2301 GAOGGTCAGA CCAATGCGCT AAAAATGGG

Sequenzprotokoll D (ChiG):

Seq IDNo.: 4

Art der Sequenz: Nukleotid

Sequenzlänge: 1013 Nukleotide

Art des Molkeküls: cDNA

Ursprüngliche Herkunft: Gerstesamen (*Hordeum vulgare* L.)

Name: ChiG (Chitinase-G)

Merkmal:

63 pb-lange 5'-nicht übersetzende Anfangsregion, 798 pb offenes
Ableseraster, 152 pb-langes 3'-nicht übersetztes Ende, Ablese-
stopcodons sind mit einem Sternchen markiert, die wahrschein-
lichen Signalpeptidsequenzen sind unterstrichen, die abge-
leitete Aminosäuresequenz eines 26 kD-Chitinase Präproteins
mit 266 Aminosäuren ist unterhalb der Nukleotidsequenz ange-
geben, die unterstrichene AT-reiche Sequenz bei Position 905
ist wahrscheinlich ein Polyadenylierungssignal.

Eigenschaften:

Antifungal wirksam, insbesondere gegen *Trichoderma reesii* und
fusarium sporotrichoides sowie *Rhizoctonia solani* und *Botrytis*
cinerea.

D CCTACGACAGTACGCTAACGGTAACACCGAGTACCGTACTCTCTGCTTTGTTGGCTCCG 60
ACAATGAGATCGCTCGCGGTGCTGCTGGCCGCTGCTAGCCACGGTGGCCATCGGC 120
M R S L A V V V A V V A T V A M A I G
-20 -10

ACGGCGCGCGGACGCTGCTCTCCATCGTCTCGCGCGCACAGTTTGACCGCATGCTTCTC 180
T A R G S V S S I V S R A Q F D R M L L
-1 1 10

CACCGCAACGACGGCGCTGCGCAGGCCAAGGGCTTCTACCTACGACGCTTCGTCGCC 240
H R N D G A C Q A K G F Y T Y D A F V A
20 30

GCGGCAGCGCGCTTCCCGGGCTTCGGCACCACCGCGCAGCGCGCAGCGCGCAGCGCGAG 300
A A A A F P G F G T T G S A D A Q K R E
40 50

GTGGCGCGCTTCTAGCACAGACCTCCCAAGAGACCAACCGCGCGGTGGCGGACTGCACCG 360
V A A F L A Q T S E K T T G C G W A T A P
60 70

GACCGCGCTTCCGCTGGCGCTACTGCTTCAAGCAGCAACGTGGCGCTCTCCGACTAC 420
D G A F A W G Y C F K Q E R G A S S D Y
80 90

TGCACCGCGGACGACAAATGCGCGTGGCGCGCGCGGAGCGCTACTACGGCGCGCGGCA 480
C T F S A Q W P C A F G K R Y Y G F G P
100 110

ATCCAGCTCTCCCACTACAACTATGGACCTGCCGGCCGGCCATCGGGGTCGATCTG 540
I O L S E M Y N Y G P A G R A I G V D L
120 130

5 CTGGCCAACCCGGACCTGCTGGCCACGGACGCCACTGTGGCCTTTAAGACGGCCATCTGG 600
L A N P D L V A T D A T V G F K T A I W
140 150

10 TTCTGGATGACGGCGCAGCCGCCCAAGCCATCGAGCCATGCTGTGATCGCCGGCCAGTGG 660
F W M T A Q P P K P S S E A V I A G Q W
160 170

15 AGCCCGTCAGGGGCTGACCGGGCCCGCAGCCCGGGTCCCCGGTTTGGTGTGATCACCAAC 720
S P S C A D R A A G R V P G F G V I T H
180 190

ATCATCAACGGCGGGATCGAGTCCGGTCACGGGCAGGACAGCCGGCTCGCCGATCGAATC 780
I I N G G I E C G H G Q D S R V A D R I
200 210

20 GGGTTTTACAAGCGCTACTGTGACATCTCTGGCGTTGGCTACGGCAACAACCTCGATTGC 840
G F Y K R Y C D I L G V G Y G N N L D C
220 230

25 TACAGCCAGAGACCCCTTCGGCTAATTAATTAGTCATGTATTAATCTTGGCCCTCCATAAA 900
Y S Q R P F A *
240

30 ATACAATAAGAGCATCGTCTCCTATCTACATGCTGTAAGATGTAAGTATGTTAACCTTTT 960

35

40

45

50

55 ATGGCGAACATAACAAAGGCATCTCGTATAGATGCTTTGCTA₁₂ 1013

Sequenzprotokoll E (GluG):

5 Seq IDNo.: 5

Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein

Sequenzlänge: 1249 Nukleotide

Art des Moleküls: cDNA

10 Ursprüngliche Herkunft: Gerstesamen (Hordeum vulgare L.)

Name: GluG (Glukanase)

Merkmale: 48 bp-lange 5'-nicht übersetzende Anfangsregion

15 Offenes Ableseraster von 1002 bp

199 pb-langes 3'-nicht übersetztes Ende,

die unterstrichene At-reiche Sequenz bei den Position 1083 und

1210 sind wahrscheinlich Polyadenylierungssignale,

20 die abgeleitete Aminosäuresequenz des codierten Präproteins von 334 Aminosäuren wird unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben.

E

```

25  GCCACCATTCATAGCAATTTGAGCAACAGATACTCCCTCTGTCCACCAATCGCTAGAAA 60
      .                               M A F K
      .                               -28

30  GATCTGCCCTCCATGCTTTCCAGTTGCTCTCTTCATTGGAGCAATCGCTGCTGTCTTACG 120
      D V A S M F A V A L F I G A F A A V F T
      -20                               -10

35  AGTCTCCAGTCCATCGCCGCTATGCTACGGCGTGCATCGGCAACAACTCCCGCTCCCGGAGC 180
      S V Q S I G V C Y G V I G M N L F S R S
      -1 +1                               10

40  GACCTGCTCCAGCTCTACAGGTCCAGGGCATCAACGTCATGCTCATCTACTTCCCGGAC 240
      D V V Q L Y R S K G I N G M R I Y F A D
      20                               30

45  GCGGAGGCGCTCTTCGGCGCTCCGCAACTCCGGCATCGGCGCTCATCTCTGACATCGGCAAC 300
      G Q A L S A V R N S G I G L I L D I G N
      40                               50

50  GACCAGCTCGGCAACATCGCCGCGGAGGACCTCCAGCGGCGGCTCTCTCGGTCGAGAAC 360
      D Q L A N I A A S T S W A A S W V Q N N
      60                               70

55  GTCCGCGCGCTACTACGCTCCGCTCAACATCAACTACATCGGCGCGGCGGCAACGAGCTCCAG 420
      V R F Y Y P A V N I K Y I A A G N E V Q
      80                               90

60  GCGGCGGCGCAAGGAGAGGATCTCTCGGCGGCAATCGGCAACTCAACGCGGCGGCTCTCTCGCG 480
      G G A T Q S I L F A M R N L N A A L S A
      100                               110

```

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

GCGGGGCTCGGGGGCATCAAGGTGTCCAGCTCCATCCGGTTCGACGAGGTGGCCAACTCC 540
 A G L G A I K V S T S I R F D E V A N S
 120 130

TTCCCGCCCTCGGGGGCGGTGTTCAAGAACCCCTACATGACCGAGGTGGGGGGCGCTCTG 600
 F P P S A G V F K N A Y M T D V A R L L
 140 150

CCGAGCACCGGGGGGGCGCTGCTCCCAAGCTCTACCCCTACTTCGGGTACCGTCACAAC 660
 A S T G A F L L A N V Y F Y F A Y R D N
 160 170

CCGCGGAGCATCAGCTCTGAATACCGGAGCTTCCAGCGGGGGCAGCACCGTGGGTGACCGAG 720
 P G S I S L N Y A T F Q P G T T V R D Q
 180 190

AACAAACGGGCTGACCTACACGTCCCTGTTCGACCGGATGCTGGACGCGGTGTACCGGGCC 780
 M N G L T Y T S L F D A M V D A V Y A A
 200 210

CTGGAGAAAGCCCGGGGGCGGGGGGTGAAGGTGGTGGTGTGGAGAGCGGGTGGGGCTGG 840
 L E K A C A P A V K V V V S E S C H P S
 220 230

CCGGGCGGGTTTCGGGGCTGGGGGGCGCAATCCCGGCACTACAAACAGGGGGTGCATCAAC 900
 A G G F A A S A G N A R T Y N Q G L I N
 240 250

CACGTCCCGCGGGGGACGGCCAAAGAACCGGGAGCGGCTGGAGACGTACATCTTCCCATG 960
 E V G G G T P K K R E A L E T Y I F A N
 260 270

TTCAGCGAGAACGAGAGACCGGGGACGGCACGGAGAGCTTCGGGCTCTTCAACCGG 1020
 F N E N Q K T G D A T E R S F G L F N P
 280 290

GACAAGTCCGGGGCATACACATCCAGTTCTAGTACGTGTAGCTACCTAGCTCACATACC 1080
 D K S P A Y N I Q F
 300

TAAATAAATAAGCTCCAGCTACGTACGTAATCCGGCATCCAGGTGTACCTAGCACGTA 1140

CATTCATTCATCGAGAGTCCAAACCAAGCATCGCTAACTTCTGGTGCATGATACATCAT 1200

CATGCTATCAATAAAGATATCCAGATGTATCA 1249

Patentansprüche

1. Transgener pathogen-resistenter Organismus
dadurch gekennzeichnet, daß sein Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter Kontrolle

aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält.

2. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 1,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Gene für Genprodukte codieren, die die Vitalität von Pilzen herabsetzen.
3. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Gene pilzlichen, bakteriellen, pflanzlichen, tierischen oder viralen Ursprungs sind.
4. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 2 oder 3,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Genprodukte die Pilzresistenz fördernde Eigenschaften haben.
5. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Genprodukte
Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP)
sind.
6. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch **gekennzeichnet**, daß dieser eine Pflanze ist.
7. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um eine Tabak-, Kartoffel-, Erdbeer-, Mais-, Raps- oder Tomatenpflanze handelt.
8. DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche.
9. Verfahren zur Erzeugung pathogen-resistenter Organismen nach einem der Ansprüche 1-7,
dadurch **gekennzeichnet**, daß in das Genom eines Organismus mindestens ein Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung transferiert und der pathogen-resistente Organismus
a) durch Kreuzung des Organismus mit einem gegebenenfalls transgenen weiteren Organismus, der mindestens ein anderes Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält, und anschließende Selektion und/oder
b) durch Transformation mindestens eines anderen Gens mit pathogen-inhibierender Wirkung in den Organismus
erhalten wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch **gekennzeichnet**, daß DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen entsprechend einem Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 beschrieben, verwendet werden.
11. Verfahren zur Erzeugung pathogen resistenter Organismen nach einem der Ansprüche 1-7 ,
dadurch **gekennzeichnet**, daß zur Transformation in das Genom eines Organismus Vektoren verwendet werden, die mehr als ein Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung umfassen.
12. Verfahren zur Gewährleistung der Resistenz von Organismen gegen Pathogene,
dadurch **gekennzeichnet**, daß als Organismus ein transgener pathogen-resistenter Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Organismus, dessen Genom mindestens ein Gen gemäß der Definitionen der Ansprüche 1 bis 7 enthält, verwendet und auf den Organismus mindestens eine Substanz aufgebracht wird, die nicht durch den Organismus exprimiert wird, aber irgendeinem anderen der Genprodukte gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 entspricht.

Fig. 1

PSI - AFP

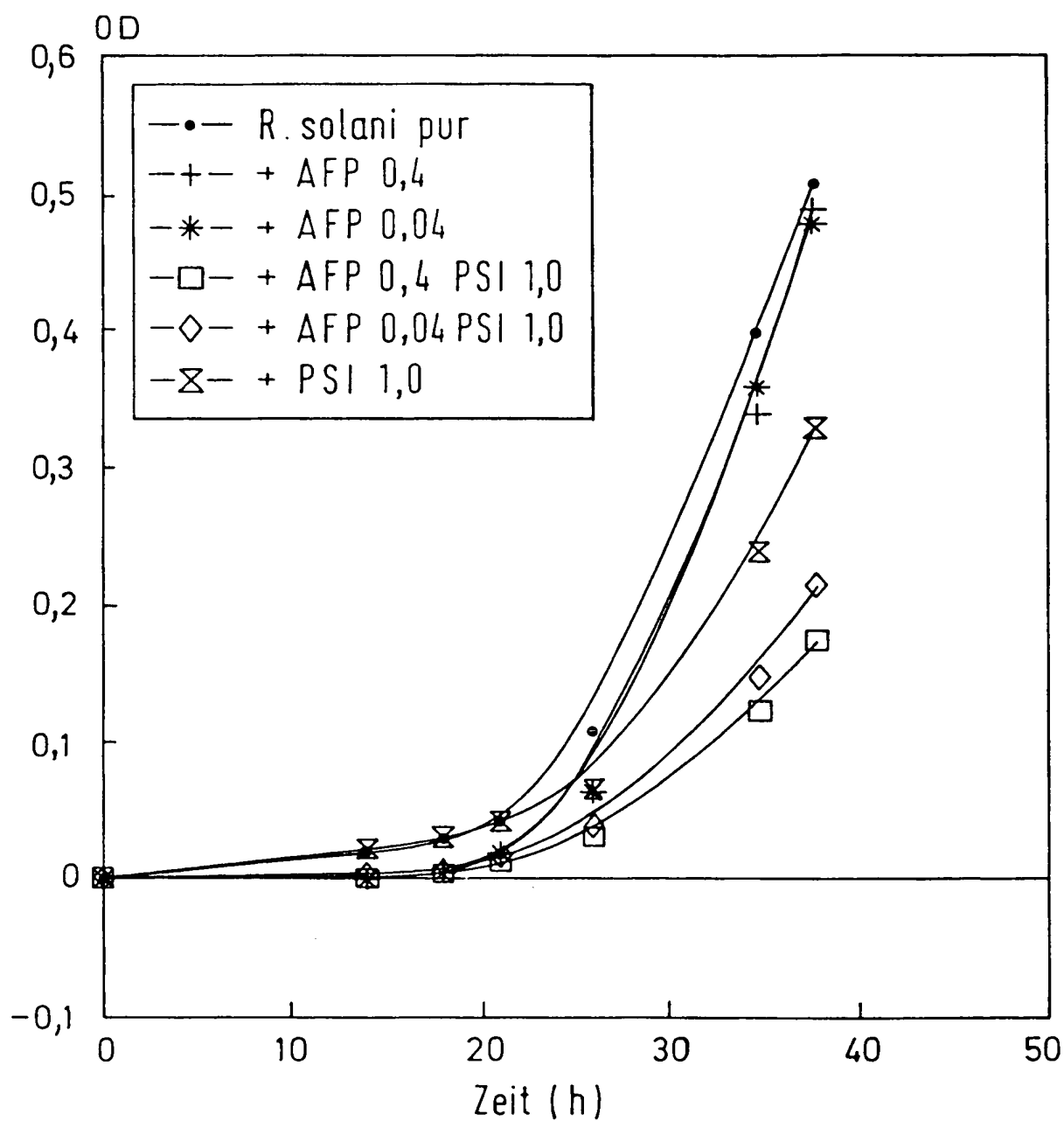
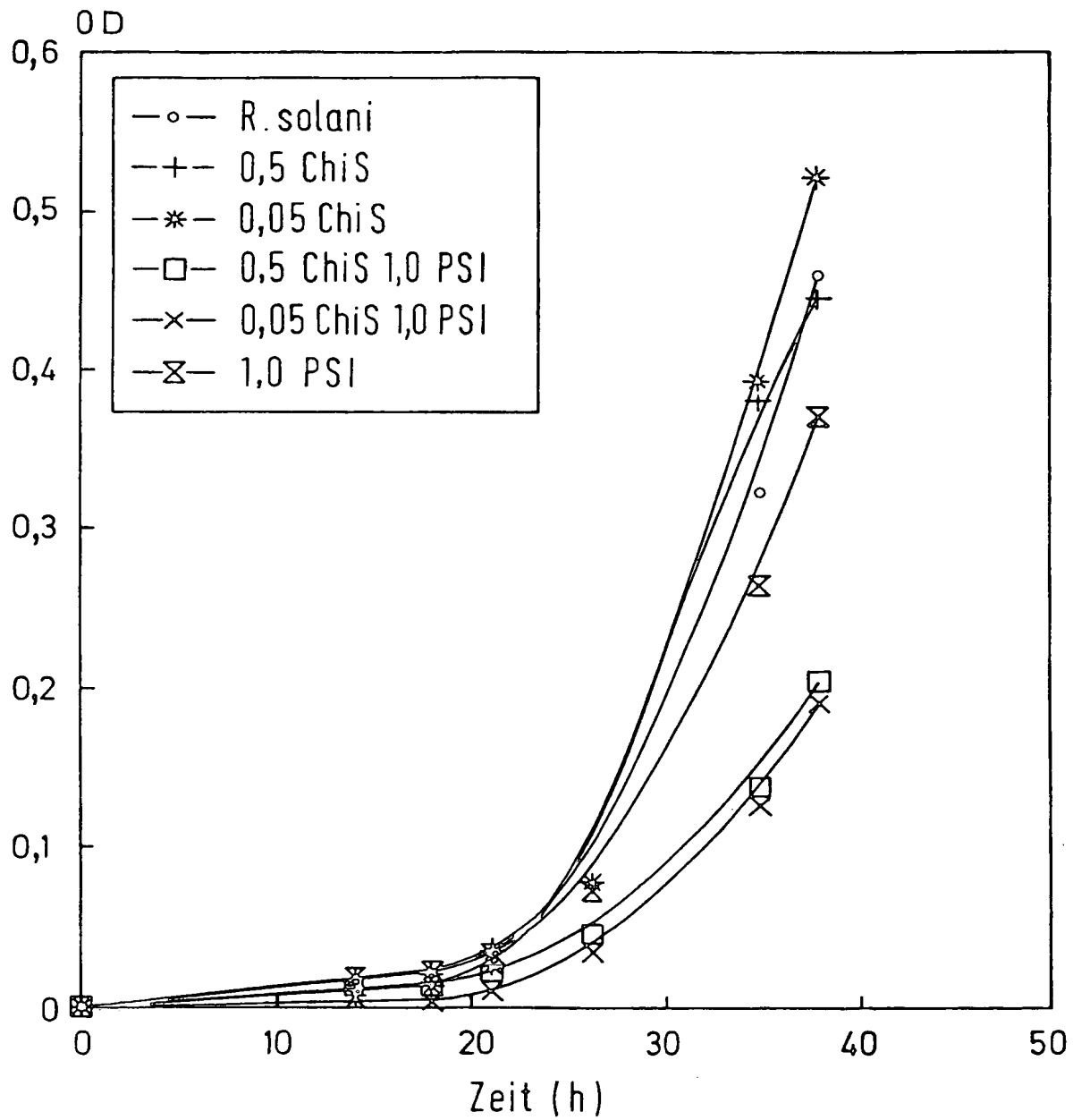


Fig. 2

ChiS + PSI





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 616 035 A3**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 93116011.3

51 Int. Cl.⁶: **C12N 15/82, C12N 15/56,
C12N 15/29, A01H 5/00,
A01N 63/00**

22 Anmeldetag: 04.10.93

30 Priorität: 09.10.92 DE 4234131

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.09.94 Patentblatt 94/38

84 Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI NL PT
SE**

88 Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 15.02.95 Patentblatt 95/07

71 Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften e.V.
Bunsenstrasse 10
D-37073 Göttingen (DE)**

72 Erfinder: **Logemann, Jürgen, Dr.
Lavendeltuין 5
NL-2317 NB Leiden (NL)
Erfinder: Jach, Guido
Maternusstrasse 22**

**D-50678 Köln (DE)
Erfinder: Görnhardt, Birgit
Auf dem Knöpp 28
D-51145 Köln (DE)
Erfinder: Mundy, John, Dr.
NY Carlsberg Vej 6, 4th
1760 V Copenhagen (DK)
Erfinder: Schell, Jeff, Prof.
Carl-vonLinne-Weg 10
D-50829 Köln (DE)
Erfinder: Eckes, Peter, Dr.
Am Flachsland 18
D-65779 Kelkheim (Taunus) (DE)
Erfinder: Chet, Ilan, Prof.
Shikun Ezrachi
Nes Ziona 70400 (IL)**

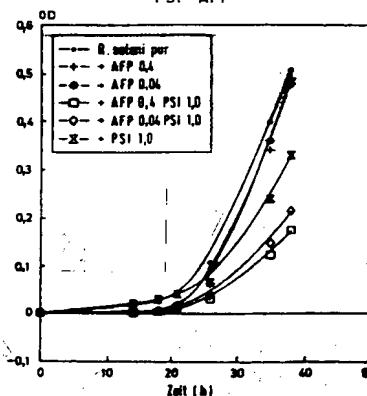
74 Vertreter: **von Hellfeld, Axel, Dr. Dipl.-Phys.
Wuesthoff & Wuesthoff
Patent- und Rechtsanwälte
Schweigerstrasse 2
D-81541 München (DE)**

54 **Transgener Pathogen-resistenter Organismus.**

57 Transgener pathogen-resistenter Organismus dessen Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter Kontrolle aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält. Dieser Organismus zeichnet sich durch eine synergistische pathogen-inhibierende Wirkung aus. Diese Wirkung tritt besonders dann auf, wenn die Gene für die Genprodukte Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP) kodieren.

Fig. 1

PSI - AFP



EP 0 616 035 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 93 11 6011

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
X	WO-A-89 04371 (LOUISIANA STATE UNIVERSITY) 18. Mai 1989 * Beispiel 14 *	1-4, 6-10	C12N15/82 C12N15/56 C12N15/29 A01H5/00 A01N63/00
X	EP-A-0 440 304 (MOGEN) 7. August 1991 * das ganze Dokument *	1-11	
X	DEV. PLANT PATHOL. 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), SYMP. HELD AUG. 24-27, 1992 Seite 449 BOJSEN, K., ET AL. 'Genetic transformation of Nicotiana benthamiana with chitinase and beta-1,3-glucanase genes from Beta vulgaris (sugar beet)' * das ganze Dokument *	1-11	
X	US-A-4 970 168 (TUMER) 13. November 1990 * das ganze Dokument *	1, 11	
P, X	WO-A-92 17591 (DANISCO) 15. Oktober 1992 * Abbildungen 18, 22; Beispiel 15 *	1-11	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5)
Y	BIOTECHNOLOGY, Bd. 10, Nr. 3, März 1992, NEW YORK US Seiten 305 - 308 LOGEMANN, J., ET AL. 'Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants' * Seite 307, linke Spalte *	1-12	C12N A01H A01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchezert DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 12. Dezember 1994	Prüfer Maddox, A
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 93 11 6011

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd.266, Nr.3, 25. Januar 1991, BALTIMORE, MD US Seiten 1564 - 1573 LEAH, R., ET AL. 'Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins and antifungal properties' * Seite 1565, rechte Spalte *	1-12	
Y	BIOPRACTICE, Bd.1, 1992 Seiten 33 - 40 JACH, G., ET AL. 'Expression of a bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection' * das ganze Dokument *	1-12	
A	CURRENT PLANT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE, VOL.14. ADVANCES IN MOLECULAR GENETICS OF PLANT-MICROBE INTERACTIONS, VOL. 2. 6TH SYMPOSIUM ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS JULY, 1992. Seiten 567 - 571 DUNSMUIR, P., ET AL. 'Resistance to Rhizoctonia-solani in transgenic tobacco' * das ganze Dokument *	1-12	
A	SCIENCE, Bd.254, 1991 Seiten 1194 - 1197 BROGLIE, K., ET AL. 'Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia solani' * das ganze Dokument *	1-12	
A	WO-A-92 16632 (ELF SANOFI) 1. Oktober 1992 * Seite 38 - Seite 39 *	1-12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 12. Dezember 1994	Prüfer Maddox, A
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument I : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 (03.92) (P4/C01)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 93 11 6011

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
A	WO-A-91 19738 (HOECHST) 26. Dezember 1991 * das ganze Dokument * ---	1-12	
A	US-A-4 940 840 (SUSLOW) 10. Juli 1990 * Spalte 19 - Spalte 20 * ---	1-12	
E	WO-A-94 08009 (MOGEN) 14. August 1994 * Beispiel 7 * -----	1-11	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 12. Dezember 1994	Prüfer Maddox, A
<div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</div> <div><div>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</div><div>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div></div>			

EPO FORM 1503 03.92 (PM/C01)